

Rec'd PCT/PTO 07 DEC 2004

10/517038



Mod. C.E. - 1-4-7

EP/03/5993

**Ministero delle Attività Produttive**  
**Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività**  
**Ufficio Italiano Brevetti e Marchi**  
**Ufficio G2**

REC'D 26 AUG 2003

WIPO PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: **Invenzione Industriale**

N. TO2002 A 000477



*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto supraspecificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

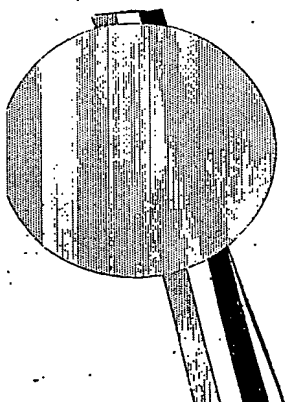
Roma, 4 LUG. 2003

IL DIRIGENTE

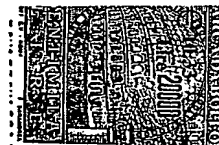
*Elena Marinelli*

**Sig.ra E. MARINELLI**

**BEST AVAILABLE COPY**



**AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO** **MODULO A**  
**UFFICIO ITALIANO BREVETTI - TORINO**  
**DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO**

**A. RICHIEDENTE (I)**

1) Denominazione IGEIA S.R.L. codice 01021130382  
 Residenza CARPI (MO)  
 2) Denominazione \_\_\_\_\_ codice \_\_\_\_\_  
 Residenza \_\_\_\_\_ codice \_\_\_\_\_

**B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.**

cognome e nome BONGIOVANNI Simone e altri cod. fiscale \_\_\_\_\_  
 denominazione studio di appartenenza STUDIO TORTA S.r.l.  
 via Viotti n. 0009 città TORINO cap 10121 (prov) TO

**C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario**

via \_\_\_\_\_ n. \_\_\_\_\_ città \_\_\_\_\_ cap \_\_\_\_\_ (prov) \_\_\_\_\_

**D. TITOLO**

classe proposta (sez/cl/sci) \_\_\_\_\_

gruppo/sottogruppo \_\_\_\_\_

DISPOSITIVO PER ELETTROPORAZIONEANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☐

SE ISTANZA: DATA \_\_\_\_\_

N° PROTOCOLLO \_\_\_\_\_

**E. INVENTORI DESIGNATI**

cognome nome

cognome nome

1) MIKLAVCIC Damijan 3) \_\_\_\_\_  
 2) MIR Lluís 4) \_\_\_\_\_

**F. PRIORITÀ**

| nazione o organizzazione | tipo di priorità | numero di domanda | data di deposito | allegato S/R | SCIoglimento RISERVE<br>Data | N° Protocollo |
|--------------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------|------------------------------|---------------|
| 1) _____                 | _____            | _____             | ____/____/____   | _____        | ____/____/____               | _____         |
| 2) _____                 | _____            | _____             | ____/____/____   | _____        | ____/____/____               | _____         |

**G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione****H. ANNOTAZIONI SPECIALI**

Per la migliore comprensione dell'invenzione è stato necessario depositare disegni con diciture come  
 convenuto dalla Convenzione Europea sulle formalità alle quali l'Italia ha aderito.

**DOCUMENTAZIONE ALLEGATA**

N. es.

Doc. 1) 2 PROV n. pag. 25 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) ....  
 Doc. 2) 2 PROV n. tav. 03 disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare) .....  
 Doc. 3) 1 X lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale .....  
 Doc. 4) 1 RIS designazione inventore .....  
 Doc. 5) 1 RIS documenti di priorità con traduzione in italiano .....  
 Doc. 6) 1 RIS autorizzazione o atto di cessione .....  
 Doc. 7) 1 nominativo completo del richiedente

| SCIoglimento RISERVE<br>Data | N° Protocollo |
|------------------------------|---------------|
| ____/____/____               | _____         |
| ____/____/____               | _____         |
| ____/____/____               | _____         |
| ____/____/____               | _____         |
| ____/____/____               | _____         |
| ____/____/____               | _____         |

8) attestati di versamento, totale Euro Duecentonovantuno/80 obbligatorio

COMPILATO IL 07/06/2002

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

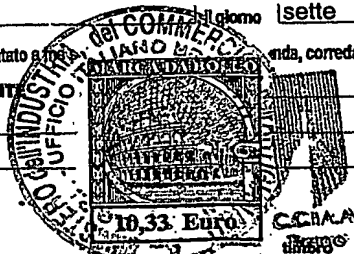
BONGIOVANNI SimoneCONTINUA S/NO NODEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA S/NO SICAMERA DI COMMERCIO IND. ART. AGR. DI TORINO codice 0101VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA 10 2002 A000477 Reg. AL'anno duemiladue il giorno sette del mese di GiugnoIl (I) richiedente (I) sopraindicato (I) ha (hanno) presentato a me, nota, corredata di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.**I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE**

**RISERVA NON PREVISTA DALLA**  
**CIRCOLARE n. 423 del 01-03-2001**

Silvana BUSSO

CATEGORIA ROGANTE

IL DEPOSITANTE



Classe proposta (sez./cl./scl/)

(gruppo/sottogruppo)

## L. RIASSUNTO

Dispositivo di elettroporazione per la permeabilizzazione di cellule (C) contenute in un substrato (12) comprendente un generatore di segnale (3) per generare un segnale di stimolazione (S(t)) applicato per mezzo di elettrodi (6, 7) al substrato (12) in cui viene indotto un campo elettrico (E(t)) che permeabilizza le membrane delle cellule. Il dispositivo calcola e controlla (15, 16, 23) il valore istantaneo oppure il rapporto GT tra la corrente ( $i_e$ ) che fluisce attraverso il substrato (12) e la tensione ( $V_p$ ) del segnale di stimolazione (S(t)) applicato al substrato (12); in particolare il segnale di stimolazione viene applicato in modo modificato secondo la forma della porzione iniziale della forma d'onda di una curva  $i_{GT}$  che rappresenta il valore del rapporto GT in istanti successivi dopo l'applicazione del segnale di stimolazione (S(t)). Il sistema consentirà la permeabilizzazione delle cellule di un substrato con nessun danno o con danni minimi, consentendo l'introduzione o l'estrazione di molecole in o dalle cellule viventi elettroporabilizzate. (Fig. 1)

## M. DISEGNO

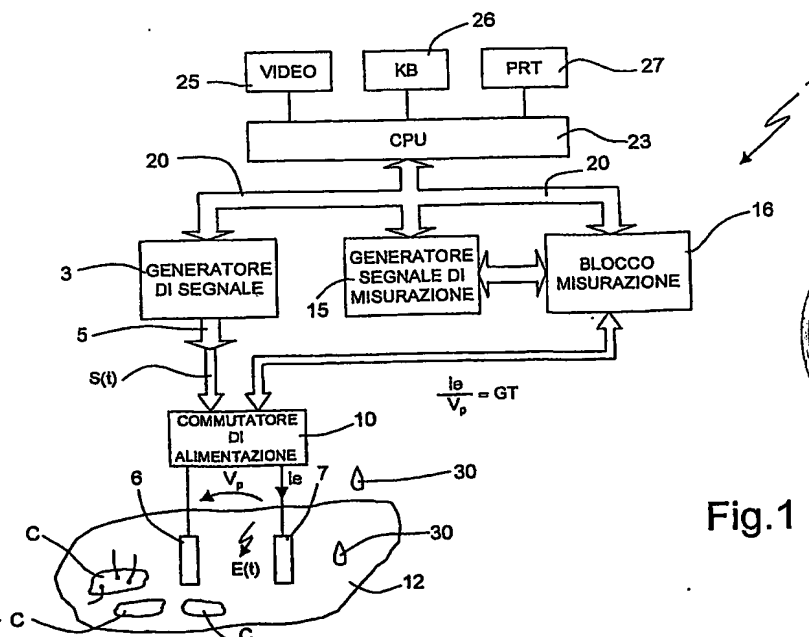


Fig.1



C.C.I.A.A.  
Torino

## DESCRIZIONE

del brevetto per invenzione industriale  
di IGEA S.R.L.

di nazionalità italiana, con sede

a 41012 CARPI (MODENA) - VIA PARMENIDE, 10/A

Inventori designati: MIKLAVCIC Damijan

MIR Lluís

10 2002 A 000477

\*\*\* \*\*

La presente invenzione si riferisce ad un dispositivo per elettroporazione. Come è noto, recenti applicazioni biologiche, microbiologiche e farmacologiche comportano l'introduzione di molecole all'interno delle cellule, il che viene fatto introducendo le molecole attraverso le membrane cellulari.

Le molecole possono essere sostanze inorganiche (per esempio farmaci) oppure molecole organiche (molecole di DNA, per esempio, sono note per venire introdotte nelle cellule).

Per introdurre le molecole, sono stati recentemente ideati i cosiddetti metodi di elettroporazione, che sono basati sull'applicazione di impulsi elettrici alle cellule per produrre un campo elettrico che rende permeabile la struttura cellulare consentendo alle sostanze di penetrare nella mem-

BONGIOVANNI Simone  
iscrizione Albo nr. 615/BW

brana cellulare. Per esempio, la Domanda di Brevetto PCT WO01/07583 descrive un dispositivo di elettroporazione in cui una tensione elettrica viene applicata ad un substrato comprendente cellule ed una corrente fluisce attraverso il substrato. La suddetta domanda di brevetto propone pure di rilevare continuamente il rapporto della corrente attraverso il substrato rispetto alla tensione, così da ottenere una indicazione del grado di elettroporazione nel substrato. Infine, la Domanda WO01/07583 propone di regolare la grandezza della tensione applicata in funzione dei cambiamenti del rapporto suddetto per ottenere un grado controllato di elettroporazione nel substrato.

Tuttavia, la Domanda di Brevetto WO01/07583 non insegna come usare l'informazione relativa al rapporto suddetto per ottenere una informazione utile per il controllo della tensione. In altre parole, WO01/07583 descrive semplicemente la possibilità di controllare la tensione in base alla rilevazione del rapporto suddetto ma non fornisce alcuna reale indicazione per creare un sistema operativo in cui il controllo della tensione venga eseguito con successo.

Scopo della presente invenzione è quello di

BONGIOVANNI Simone  
Iscrizione Albo nr. 615/BMI

fornire un dispositivo di elettroporazione operativo in cui il controllo della tensione applicata al substrato viene ottenuto per mezzo del monitoraggio continuo del rapporto della corrente che fluisce attraverso il substrato e della tensione applicata al substrato.

Lo scopo suddetto viene ottenuto mediante la presente invenzione e si riferisce ad un dispositivo di elettroporazione descritto nella rivendicazione 1 o 11.

L'invenzione verrà descritta secondo i disegni allegati che mostrano una realizzazione non limitativa dell'invenzione, in cui:

la Figura 1 mostra, in modo semplificato, un dispositivo di elettroporazione secondo la presente invenzione;

la Figura 2 è un diagramma di flusso delle operazioni eseguite dal dispositivo di elettroporazione; e

la Figura 3 illustra un rapporto di segnale tra corrente e tensione basato sul modo in cui viene eseguito il controllo dell'impulso di elettroporazione  $S(t)$ .

Nella Figura 1, il numero 1 indica un dispositivo di elettroporazione realizzato secondo la pre-

BONGIOVANNI SIMONE  
(iscrizione Albo n. 015/BM)

sente invenzione. In particolare, il dispositivo 1 è costituito da un generatore di segnale 3 per produrre un segnale di stimolazione  $S(t)$  che viene amplificato da un amplificatore di potenza 5 e applicato ad elettrodi 6, 7 attraverso un commutatore di alimentazione 10. Gli elettrodi 6, 7 sono accoppiati ad un substrato 12 contenente cellule viventi C; in particolare il substrato 12 può comprendere una porzione (per esempio un tessuto) di un corpo vivente (pianta, animale o uomo) o può comprendere un substrato separato dal corpo vivente e contenuto in un recipiente (per esempio una coltura di animale, pianta, batterica o fungale e *in vitro*).

L'applicazione del segnale di elettroporazione  $S(t)$  agli elettrodi 6, 7 provoca la creazione di un campo elettrico  $E(t)$  nel substrato 12; tale campo  $E(t)$  promuove, realizza o migliora la permeabilizzazione delle membrane delle cellule C rendendo possibile l'introduzione di molecole (organiche/inorganiche) attraverso le membrane delle cellule C.

Il dispositivo 1 comprende pure un generatore di segnale di misurazione 15 accoppiato ad un blocco misuratore 16 cooperante con gli elettrodi 6, 7 per la determinazione dei valori istantanei della

BONGIOVANNI Simone  
Iscrizione Albo nr. 015/BM



corrente attraverso il substrato 12, la tensione attualmente applicata al substrato 12 ed il rapporto GT tra corrente e tensione applicate al substrato 12 (cioè  $GT = i_e/V_p$ ).

Il generatore di segnale 3, il generatore di segnale di misurazione 15 ed il blocco di misurazione 16 sono collegati, attraverso un comune bus 20, con una unità di elaborazione centrale 23 accoppiata a circuiti di interfaccia (non illustrati), per la comunicazione con dispositivi periferici, come un display video 25, una tastiera 26 ed una stampante 27.

Sotto il controllo dell'unità di elaborazione centrale 23 il generatore di segnale 3 genera un segnale  $S(t)$  comprendente uno o una serie di impulsi la cui ampiezza può essere regolata come descritto in quanto segue. Inoltre, l'unità di elaborazione centrale 23 riceve l'informazione relativa alla tensione  $V_p$  del segnale di stimolazione  $S(t)$  applicato agli elettrodi 6, 7 e la corrente  $i_e$  che fluisce tra gli elettrodi 6, 7 attraverso il substrato 12. Più particolarmente, l'unità di elaborazione centrale 23 rivela il valore istantaneo del rapporto GT della corrente  $i_e$  che fluisce attraverso il substrato 12 e la tensione  $V_p$  applicata al

BONGIOVANNI Simone  
[iscrittione Albo nr. 615/BM]



substrato 12, cioè:  $GT = i_e/V_p$  e determina il valore istantaneo del segnale  $S(t)$ .

La conoscenza del suddetto rapporto  $GT$  viene usata per controllare il segnale di stimolazione  $S(t)$  come descritto nel diagramma di flusso di Figura 2.

Studi ed esperimenti della richiedente hanno rivelato che la curva  $C_{GT}$  che rappresenta il valore del rapporto  $GT$  in istanti successivi dopo l'applicazione del segnale di stimolazione  $S(t)$  ha una particolare forma d'onda che è rappresentata, come esempio non limitativo, nella Figura 3.

Nella presentazione cartesiana di Figura 3, l'asse  $Y$  rappresenta i valori accresciuti del rapporto  $GT$  e l'asse  $X$  rappresenta istanti successivi dopo l'inizio dell'applicazione del segnale di stimolazione  $S(t)$ ; il segnale di stimolazione  $S(t)$  essendo applicato dal tempo  $t = 0$  in avanti.

La curva  $C_{GT}$  (se il processo di permeabilizzazione procede) comprende una prima porzione  $C_{GT-I}$  che diminuisce dal tempo  $t = 0$  ad un tempo  $t = T_m$  in cui si raggiunge un minimo iniziale, una seconda porzione  $C_{GT-II}$  che aumenta dal tempo  $T_m$  in cui si raggiunge il minimo ed una terza porzione  $C_{GT-III}$  che aumenta a velocità molto bassa o è sostanzial-

BONGIOVANNI Simone  
Iscrizione Albo nr. 615/BM

mente piatta.

La curva  $C_{GT}$  (se la permeabilizzazione non è ottenuta e il processo di permeabilizzazione non procede) comprende una prima porzione  $C_{GT-I}$  che diminuisce dal tempo  $t = 0$  (la seconda porzione  $C_{GT-II}$  che aumenta dal tempo  $T_m$  è assente) ed una terza porzione  $C_{GT-III}$  che diminuisce con una velocità molto bassa o è sostanzialmente piatta.

In particolare, il blocco 100 della Figura 1 comanda la generazione del segnale di stimolazione  $S(t)$  e l'applicazione di tale segnale  $S(t)$  al substrato 12 attraverso gli elettrodi 6 e 7.

Il blocco 100 è seguito da un blocco 110 che introduce un ritardo  $T_d$  tale che il segnale di stimolazione  $S(t)$  viene applicato per almeno un periodo predeterminato di tempo  $T_d$ ; tale periodo di tempo  $T_d$  avendo un valore tale che il rapporto  $GT$  ha il tempo di raggiungere e superare il suo valore minimo iniziale  $T_m$ , in particolare il rapporto  $GT$  alla fine del ritardo  $T_d$  viene posto sulla seconda porzione  $C_{GT-II}$  della curva  $C_{GT}$ .

Il blocco 110 è seguito dal blocco 120 che determina il gradiente istantaneo  $dG$  (cioè la pendenza istantanea) del rapporto  $GT$  dopo che è stato raggiunto il minimo, cioè calcola la derivata del

BONGIOVANNI Simone  
(iscrizione Albo nr. 615/BM)

rapporto GT,  $dG = d(GT)/d(t)$ , all'inizio della seconda porzione C<sub>GT</sub>-II, o più praticamente la differenza  $\Delta G = \Delta GT / \Delta T$  a T<sub>m</sub>. Il blocco 120 è seguito dal blocco 130 che confronta la variazione istantanea calcolata dG del rapporto GT con un valore di riferimento dG<sub>ref1</sub>, per esempio dG<sub>ref1</sub> = 1.

In particolare, se la variazione istantanea calcolata dG del rapporto GT è superiore al valore di riferimento dG<sub>ref1</sub> (per esempio dG > 1) il blocco 130 è seguito dal blocco 140. Se il segnale applicato S(t) è di ampiezza troppo piccola per iniziare il procedimento di permeabilizzazione il primo minimo non viene raggiunto entro il tempo predeterminato T<sub>m</sub> ed il gradiente in T<sub>d</sub> è inferiore ad un valore predeterminato dG<sub>ref2</sub>, per esempio dG<sub>ref2</sub> = 0, il dG al T<sub>d</sub> è negativo (dG < 0) ed il blocco 130 è seguito da blocco 180, mentre se la variazione istantanea calcolata dG del rapporto GT è minore del valore di riferimento dG<sub>ref1</sub> e allo stesso tempo maggiore di dG<sub>ref2</sub> (per esempio 0 < dG < 1) il blocco 130 è seguito dal blocco 150.

Il blocco 140 esegue una correzione urgente al segnale di stimolazione S(t) per evitare lesioni, danni o alterazioni irreversibili nel substrato 12; sotto tale aspetto il blocco 140 è seguito da un

BONGIOVANNI Simone  
(iscrizione Albo nr. 615/BM)



blocco 145 che diminuisce l'ampiezza (cioè la tensione) del segnale di stimolazione  $S(t)$  per prevenire il deterioramento nelle cellule C.

Il blocco 150 calcola la variazione media  $\Delta G$  del rapporto GT (cioè la pendenza calcolata in un certo periodo di tempo) in un intervallo che è successivo all'istante  $T_m$  in cui il minimo è stato raggiunto e che ha una ampiezza di tempo predeterminata, per esempio  $\Delta G = \Delta GT / (T_1 - T_m)$  in cui  $T_1 > T_m$ .

Il blocco 150 è seguito da un blocco 160 che confronta la variazione media calcolata  $\Delta G$  del rapporto GT con un intervallo di riferimento dei valori  $\Delta G$ , per esempio un intervallo di riferimento avente limiti zero e  $\Delta G_{obb}$  in cui  $\Delta G_{obb}$  è un valore previsto della variazione media  $\Delta G$  al di sopra del quale gli impulsi corrispondenti porteranno ad una permeabilizzazione troppo intensa delle cellule con successivi danni alle cellule stesse.

In particolare il blocco 160 esegue le seguenti funzioni:

- se la variazione media calcolata  $\Delta G$  del rapporto GT cade nell'intervallo di riferimento (per esempio  $0 < \Delta G < \Delta G_{obb}$ ) il blocco 160 viene seguito da un blocco 170;

- se la variazione media calcolata  $\Delta G$  del rap-

BONGIOVANNI Simone  
Iscrizione Albo nr. 615/BM

porto GT cade al di fuori dell'intervallo di riferimento ed è minore di entrambi i limiti che delimitano l'intervallo (per esempio  $\Delta G < 0 < \Delta G_{obb}$ ) il blocco 160 viene seguito da un blocco 180; e

- se la variazione media calcolata  $\Delta G$  del rapporto GT cade all'esterno dell'intervallo di riferimento ed è più grande dei limiti che delimitano l'intervallo (per esempio  $\Delta G > \Delta G_{obb} > 0$ ) il blocco 160 viene seguito dal blocco 140.

Il blocco 180 aumenta la tensione del segnale di stimolazione per aumentare il valore del campo elettrico  $E(t)$  applicato al substrato 12; il blocco 180 è quindi seguito dal blocco 110.

Il blocco 170 aumenta la tensione nel segnale di stimolazione ad una tensione obbiettivo  $V_{opt}$  per aumentare il valore del campo elettrico  $E(t)$  applicato al substrato 12 cosicché il valore di  $\Delta G$  tenda al valore previsto  $\Delta G_{obb}$ .

Quando la tensione obbiettivo  $V_{opt}$  è stata raggiunta, il blocco 170 viene seguito da un blocco 190 che mantiene il segnale di stimolazione alla tensione obbiettivo  $V_{opt}$  per un tempo predeterminato che è sufficiente per raggiungere una completa elettroporazione delle cellule C.

Infine, il blocco 190 può essere seguito da un

BONGIOVANNI Simone  
Iscrizione Albo nr. 615/BMI

blocco 195 che interrompe l'applicazione di impulsi nel segnale di stimolazione  $S(t)$  o da un blocco 200 il quale, se necessario, continua per un ulteriore periodo di tempo l'applicazione del segnale di stimolazione dello stesso valore o di un valore diverso (per esempio minore), a seconda della molecola da introdurre.

Nell'uso reale, gli elettrodi 6, 7 vengono applicati al substrato 12 (rappresentato schematicamente nella Figura 1) contenente cellule viventi C. Come evidenziato in precedenza, il substrato 12 può comprendere una porzione di tessuto che costituisce parte di un essere vivente (uomo, animale o pianta) o può comprendere un tessuto o una coltura di cellule (animale o pianta) separato da un essere vivente o da una coltura di microrganismi (batteri o funghi, per esempio lievito).

Il substrato 12 viene pure applicato ad un substrato (organico o inorganico o biopolimerico) 30 da introdurre nelle cellule C. La sostanza 30 può essere applicata in vari modi, alcuni dei quali sono elencati in seguito a titolo di esempio non limitativo:

- applicazione diretta della sostanza al substrato 12 per esempio applicando al substrato un

BONGIOVANNI Simone  
iscrittione Albo nr. 615/GM

fluido contenente la sostanza;

- applicazione indiretta della sostanza, per esempio introducendo la sostanza nel sistema circolatorio della porzione di tessuto che costituisce il substrato; e

- iniettando la sostanza, cioè usando elettrodi aghiformi 6, 7 (non illustrati), ciascuno avente un condotto centrale contenente la sostanza da iniettare nella porzione di tessuto che costituisce il substrato. La sostanza può anche essere iniettata usando aghi separati dagli elettrodi.

La sostanza 30 introdotta può essere inorganica o organica o biopolimerica, per esempio

- un acido nucleico;
- una molecola di DNA contenente sequenze regolatrici e una sequenza che codifica per i geni terapeutici o i geni che interessano per scopi biomedici o biotecnologici;

- un oligonucleotide, naturale (fosfodiesteri) o modificato (all'interno della struttura dell'oligonucleotide, come fosfosolfati, o alle estremità, per aggiunta di gruppi per proteggere gli oligonucleotidi dalla digestione della nucleasi; la descrizione delle modifiche degli oligonucleotidi essendo non limitante);

BONGIOVANNI Simone  
Iscrizione Albo nr. 015/BM



- una proteina o peptide, naturale oppure modificata geneticamente o chimicamente, estratta da fonti naturali o ottenuta per sintesi, oppure una molecola che simula la struttura di una proteina o peptide, qualunque sia la sua struttura;

- un agente citotossico, il particolare l'antibiotico bleomicina o la cisplatina;

- una penicillina; e

- altri agenti farmacologici.

Il substrato 12 può anche essere trattato senza l'applicazione di una sostanza quando lo scopo è quello di estrarre dalle cellule C una molecola (organica o inorganica o biopolimerica) contenuta in o prodotta dalle cellule C. In particolare, la produzione di proteine o molecole organiche piccole formate mediante cellule modificate geneticamente o cellule scelte geneticamente, può essere raccolta dalle cellule di produzione mediante la procedura controllata ottenuta con il dispositivo descritto nella presente.

Il dispositivo di elettroporazione 1 viene attivato per generare un impulso o un treno di impulsi (blocco 100) che sono distanziati l'uno rispetto all'altro. L'elettroporazione delle cellule viene quindi iniziata ed il rapporto GT inizia a scendere

BONGIOVANNI Simone  
Iscrizione Albo nr. 615/BM



dopo la prima porzione della curva  $C_{GT}$  (cioè  $C_{GT-I}$ ).

Gli impulsi vengono applicati per un periodo di tempo (blocco 110) cosicché il rapporto  $GT$  raggiunge il suo minimo al tempo  $T_m$ ; per esempio il periodo  $T_d$  può essere di 15  $\mu s$ .

Quindi, per evitare danni alle cellule si esegue un immediato controllo (blocchi 120 e 130) per vedere se, dopo aver raggiunto il minimo, la curva  $C_{GT}$  ha un aumento troppo rapido ( $dG > 1$ ); in effetti un aumento troppo rapido dopo il minimo è una chiara indicazione di danni irreversibili alle cellule (sotto questo aspetto vedi la curva  $C_{GT}$ -irreversibile riportata nella Figura 3). Nel caso di una indicazione riscontrata di danni irreversibili, si intraprende una azione di correzione (blocchi 140 e 145) diminuendo immediatamente la tensione applicata così da impedire il danno finale alle cellule.

Nel caso in cui non si rilevi alcuna indicazione di danno la pendenza media della curva  $C_{GT}$  viene esaminata (blocco 150) per vedere se e come le cellule vengono permeabilizzate.

In particolare:

- se la variazione media calcolata  $\Delta G$  del rapporto  $GT$  scende entro un intervallo di riferimento

BONGIOVANNI Simone  
(iscrizione Albo nr 615/EM)

( $0 < \Delta G < \Delta G_{obb}$ ) si riscontra una situazione di inizio normale del procedimento di permeabilizzazione delle cellule ed il procedimento di permeabilizzazione viene normalmente proseguito aumentando la tensione (blocco 170) cosicché il valore di  $\Delta G$  tende al valore previsto  $\Delta G_{obb}$ ;

- se la variazione media calcolata  $\Delta G$  del rapporto GT cade all'esterno dell'intervallo di riferimento ed è minore di entrambi i limiti che delimitano l'intervallo ( $\Delta G < 0 < \Delta G_{obb}$ ) non si avverte alcun inizio della permeabilizzazione (sotto questo aspetto vedi la curva  $C_{GT-NO-PERM}$ ) e la tensione viene aumentata (blocco 180) per iniziare il procedimento di permeabilizzazione;

- se la variazione media calcolata  $\Delta G$  del rapporto GT cade all'esterno dell'intervallo di riferimento ed è superiore ad entrambi i limiti che delimitano l'intervallo ( $\Delta G > \Delta G_{obb} > 0$ ) si avverte una situazione potenzialmente pericolosa e si esegue quindi una azione correttiva (blocchi 140 e 145).

L'operazione suddetta può anche essere eseguita usando, invece del rapporto  $GT = i_e/V_p$ , qualsiasi combinazione matematica della corrente  $i_e$  e della tensione  $V_p$ .

Inoltre, le operazioni suddette possono anche

BONGIOVANNI Simone  
Iscrizione Albo nr. 615/BMI

essere eseguite usando, invece di qualsiasi combinazione matematica della corrente  $i_e$  e tensione  $V_p$ , il valore della corrente  $i_e$ . In effetti, la corrente  $i_e$  ha una forma molto simile a quella del rapporto GT presentato nella Figura 3.

Nel caso suddetto tutte le operazioni descritte con riferimento ai blocchi 100-200 vengono eseguite direttamente sulla corrente  $i_e$ . Per esempio, il blocco 120 determina la variazione istantanea  $di_e$  della corrente  $i_e$ , il blocco 130 confronta la variazione istantanea  $di_e$  con i valori di riferimento, il blocco 150 calcola una variazione media  $\Delta i_e$  della corrente ed il blocco 160 confronta la variazione media calcolata  $\Delta i_e$  con i valori di riferimento.

Secondo la realizzazione suddetta, è necessaria una attrezzatura più semplice per la misurazione ed il calcolo ed il dispositivo di elettroporazione fornisce un segnale di stimolazione estremamente "quadro".

È quindi chiaro che, secondo la presente invenzione, la curva  $C_{GT}$  viene costantemente monitorata ed il segnale di stimolazione viene applicato in modo modificato a seconda della forma d'onda rilevata di una porzione iniziale della curva  $C_{GT}$ .

BONGIOVANNI Simone  
(iscrittione Albo nr. 615/BM)



In particolare, l'applicazione del segnale di stimolazione dipende dalla forma della curva  $C_{GT}$ , in particolare dalla pendenza nel particolare punto di tempo.

Studi ed esperimenti eseguiti dai richiedenti hanno rivelato che controllando il procedimento di permeabilizzazione come prima evidenziato, cioè focalizzando l'analisi nella parte iniziale della forma d'onda che corrisponde all'istante iniziale in cui il procedimento è stato avviato, ma la permeabilizzazione reale non si è ancora verificata, permette da un lato di evitare danni alle cellule e dall'altro lato di ottenere la permeabilizzazione delle cellule.

BONGIOVANNI Simone  
Iscrizione Albo nr. 615/BW

## RIVENDICAZIONI

1. Dispositivo di elettroporazione per la permeabilizzazione di cellule (C) contenute in un substrato (12) comprendente mezzi di generazione di segnale (3) per generare un segnale di stimolazione ( $S(t)$ ) applicato mediante elettrodi (6, 7) al substrato (12) in cui si induce un campo elettrico ( $E(t)$ ) che permeabilizza le membrane cellulari; il dispositivo essendo caratterizzato dal fatto di comprendere:

- mezzi per misurare, calcolare e controllare (15, 16, 23) il valore istantaneo di una combinazione matematica (GT) di corrente ( $i_e$ ) che fluisce tra detti elettrodi (6, 7) e attraverso il substrato (12) e la tensione ( $V_p$ ) del segnale di stimolazione ( $S(t)$ ) applicato al substrato (12) per mezzo di detti elettrodi (6, 7);

- detto dispositivo comprendendo inoltre mezzi di controllo (100-170) per applicare il segnale di stimolazione in modo controllato secondo la forma d'onda di una porzione iniziale della curva  $C_{GT}$  che rappresenta il valore della combinazione matematica (GT) in istanti successivi dopo l'inizio dell'applicazione del segnale di stimolazione ( $S(t)$ ).

2. Dispositivo secondo la rivendicazione 1,

BONGIOVANNI Simone  
(iscrizione Albo nr. 615/BM)

in cui detto mezzo di controllo (100-170) comprende mezzi di temporizzazione (110) per applicare detto segnale di stimolazione per un periodo di tempo predeterminato  $T_d$  ed analizzare la porzione iniziale della forma d'onda della curva  $C_{GT}$  dopo che è stato raggiunto un valore minimo in detta curva  $C_{GT}$  per rivelare un valore minimo della curva  $C_{GT}$  entro l'intervallo  $t = 0$  e  $t = T_d$ .

3. Dispositivo secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui detto mezzo di controllo (100-170) calcola la pendenza della forma d'onda della curva  $C_{GT}$  dopo che è stato raggiunto un minimo nella curva  $C_{GT}$ .

4. Dispositivo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui detto mezzo di controllo (100-170) comprende mezzi di rilevazione di allarme (120) che determinano il gradiente istantaneo ( $dG$ ) di detta combinazione matematica ( $GT$ ) dopo che è stato raggiunto un minimo in detta curva  $C_{GT}$ ;

detto mezzo di controllo comprende inoltre un primo mezzo di confronto (130) per confrontare il gradiente istantaneo calcolato  $dG$  con almeno un valore di riferimento ( $dG_{ref1}$ ) e selezionare mezzi di correzione (140, 145) per eseguire una correzione

BONGIOVANNI Simone  
Ingegnere Albo nr. 615/BW

urgente del segnale di stimolazione  $S(t)$  onde evitare lesioni, danni o alterazioni irreversibili di detto substrato (12).

5. Dispositivo secondo la rivendicazione 4, in cui detto mezzo di correzione (140, 145) diminuisce la tensione del segnale di stimolazione  $S(t)$  per impedire il deterioramento delle cellule (C).

6. Dispositivo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui detto mezzo di controllo (100-170) comprende mezzi di determinazione della pendenza (150) calcolando la variazione media  $\Delta G$  di detta combinazione matematica (GT) in un intervallo di tempo successivo all'istante  $T_m$  in cui è stato raggiunto il minimo nella curva ( $C_{GT}$ ) e che ha una ampiezza di tempo predeterminata;

detto mezzo di controllo comprendendo inoltre secondi mezzi di confronto (160) che confrontano la variazione media calcolata  $\Delta G$  di detta combinazione matematica GT con un intervallo di riferimento dei valori  $\Delta G$ .

7. Dispositivo secondo la rivendicazione 6, in cui detto secondo mezzo di confronto (160) esegue le seguenti funzioni:

- se la variazione media calcolata  $\Delta G$  di detta combinazione matematica GT cade entro l'intervallo

BONGIOVANNI Simone  
licenzia Albo nr 615/BMI



di riferimento ( $0 < \Delta G < \Delta G_{obb}$ ) si scelgono mezzi di prosecuzione (170);

- se la variazione media calcolata  $\Delta G$  di detta combinazione matematica GT cade all'esterno dell'intervallo di riferimento ed è minore di entrambi i limiti che delimitano l'intervallo ( $\Delta G < 0 < \Delta G_{obb}$ ) si scelgono mezzi di regolazione (180); e

- se la variazione media calcolata  $\Delta G$  di detta combinazione matematica GT cade all'esterno dell'intervallo di riferimento ed è più grande di entrambi i limiti che delimitano l'intervallo ( $\Delta G > \Delta G_{obb} > 0$ ) si scelgono mezzi di correzione (140).

8. Dispositivo secondo la rivendicazione 7, in cui detto mezzo di regolazione (180) aumenta la tensione del segnale di stimolazione per aumentare il valore del campo elettrico  $E(t)$  applicato al substrato (12); detto mezzo di regolazione (180) seleziona successivamente detto mezzo per calcolare e monitorare (15, 16, 23) il valore istantaneo di detta combinazione matematica (GT) e detto mezzo di controllo.

9. Dispositivo secondo la rivendicazione 7, in cui detto mezzo di prosecuzione (170) aumenta la tensione del segnale di stimolazione ad una tensione obbiettivo  $V_{opt}$  per aumentare il valore del campo

BONGIOVANNI Simone  
Iscrizione Albo nr. 615/BMI



elettrico  $E(t)$  applicato al substrato (12) cosicch  il valore di detta variazione media  $\Delta G$  tenda ad essere un valore previsto  $\Delta G_{obb}$ .

10. Dispositivo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui detta combinazione matematica comprende il rapporto  $GT$  tra detta corrente ( $i_e$ ) e detta tensione ( $V_p$ ).

11. Dispositivo di elettroporazione per la permeabilizzazione di cellule (C) contenute in un substrato (12) comprendente un mezzo di generazione di segnale (3) per generare un segnale di stimolazione ( $S(t)$ ) applicato mediante elettrodi (6, 7) al substrato (12) in cui si induce un campo elettrico ( $E(t)$ ) che permeabilizza le membrane cellulari;

il dispositivo essendo caratterizzato dal fatto di comprendere:

- mezzi per misurare, calcolare e monitorare (15, 16, 23) il valore istantaneo della corrente ( $i_e$ ) che fluisce tra detti elettrodi (6, 7) e attraverso il substrato (12);

- detto dispositivo comprendendo inoltre mezzi di controllo (100-170) per applicare il segnale di stimolazione in modo controllato secondo la forma d'onda di una porzione iniziale della curva rappresentativa del valore della corrente ( $i_e$ ) in istanti

BONGIOVANNI Simone  
iscrizione Albo nr. 615/BM

successivi dopo l'inizio dell'applicazione del segnale di stimolazione ( $S(t)$ ).

12. Uso di un dispositivo come descritto in una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, per estrarre molecole dalle cellule viventi comprese nel substrato.

13. Uso di un dispositivo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti per introdurre molecole nelle cellule viventi.

14. Uso del dispositivo secondo la rivendicazione 13, in cui dette molecole sono costituite da una delle seguenti:

- una molecola di DNA contenente sequenze regolatrici e sequenze codificanti per geni terapeutici o geni che interessano per scopi biomedici o biotecnologici;

- un oligonucleotide, naturale (fosfodiesteri) o modificato (all'interno della struttura dell'oligonucleotide, come fosfo solfati, o alle sue estremità, per addizione di gruppi per proteggere gli oligonucleotidi dalla digestione da parte della nucleasi;

- una proteina o peptide, naturale oppure modificato geneticamente o chimicamente, estratto da fonti naturali o ottenuto per sintesi, oppure una molecola che simula la struttura di una proteina o

BONGIOVANNI Simone  
(iscrittione Albo nr. 615/BM)

peptide, qualunque sia la sua struttura;

- un agente citotossico, in particolare l'antibiotico bleomicina o la cisplatina;

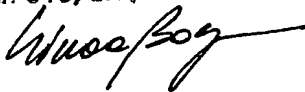
- una penicillina; e

- altri agenti farmacologici.

15. Dispositivo di elettroporazione come descritto nei disegni allegati.

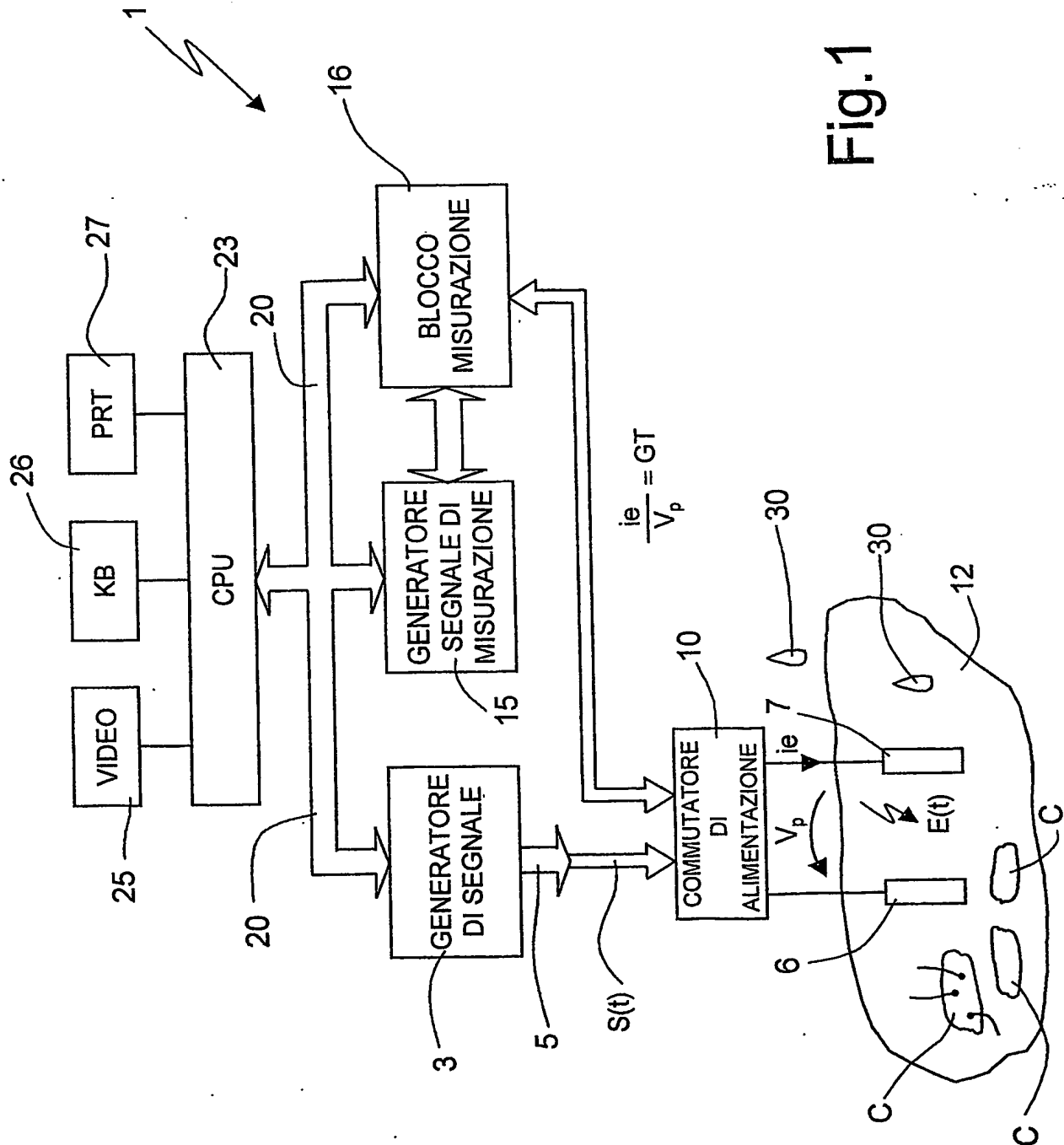
p.i. IGEA S.R.L.

BONGIOVANNI Simone  
(iscrizione Albo nr. 615/BM)



BONGIOVANNI Simone  
(iscrizione Albo nr. 615/BM)





10 2002 A000477

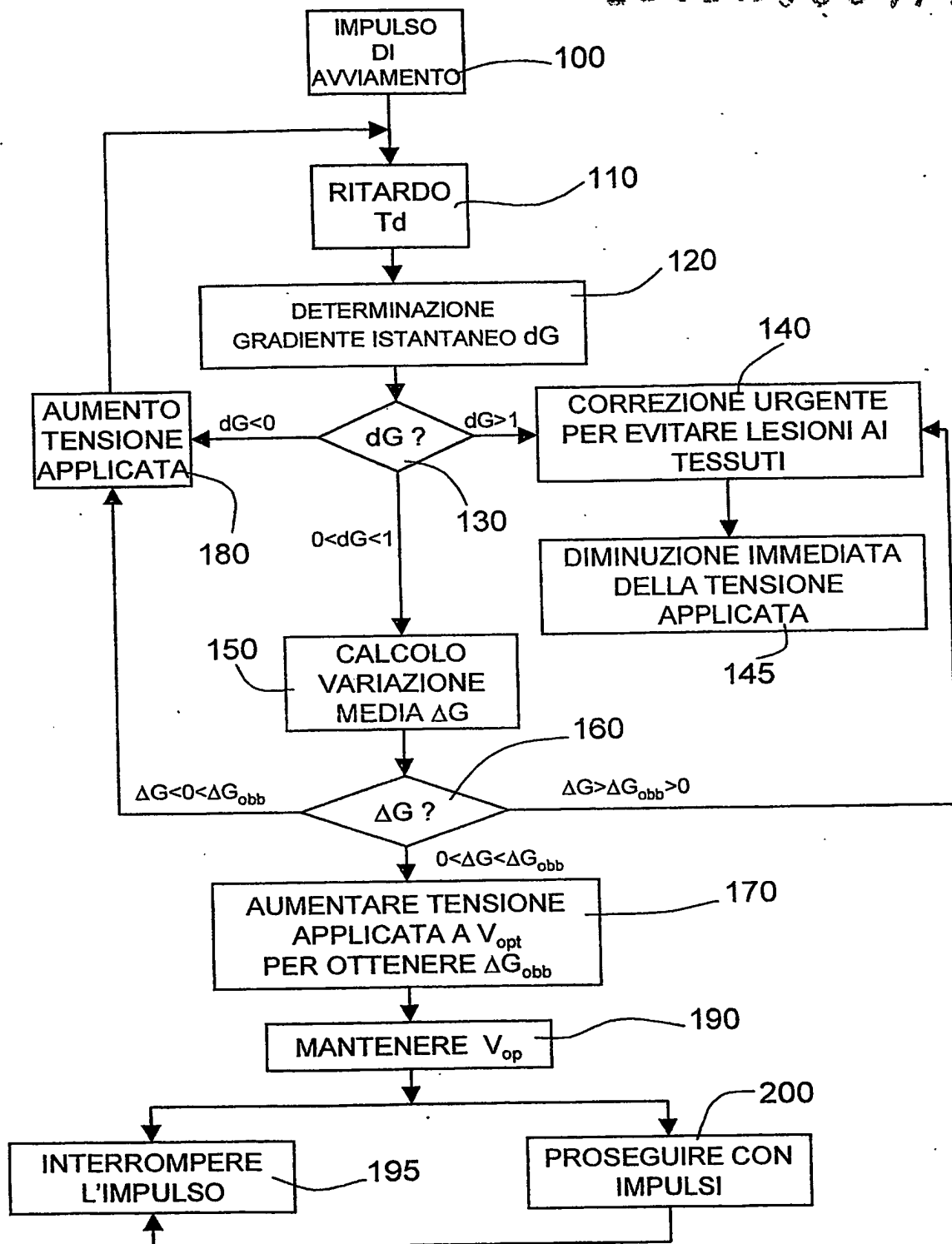


Fig.2

10 2002 A 000477

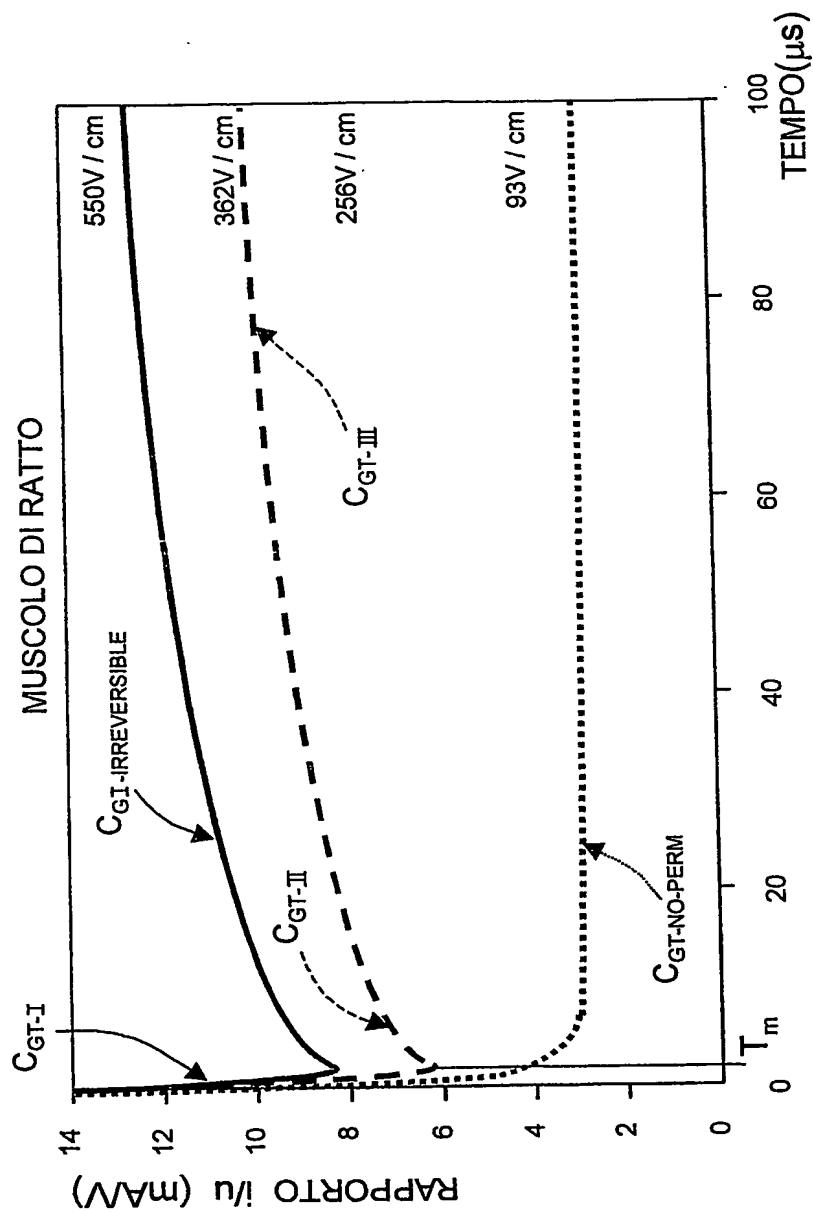


Fig.3

p.i.: IGEA S.R.L.

BONGIOVANNI, Simona  
(iscrizione Albo nr. 615/BM)



*Signature*

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**